

## Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) - Bagian 1: Metode netralisasi





© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	1
4 Peralatan .....	2
5 Bahan .....	2
6 Prosedur .....	3
7 Interpretasi hasil .....	4
8 Pelaporan .....	5
Bibliografi .....	8





## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di Laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Bagian 1: Metode netralisasi.

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 8 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor: KEP.03/MEN/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.



## Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Bagian 1: Metode netralisasi

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) dengan menggunakan metode netralisasi.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### ***aliquot***

tiap bagian yang mempunyai hubungan kuantitatif terhadap keseluruhan atau terhadap bagian lain dari keseluruhan yang sama. Contoh plasma atau serum yang diambil untuk menentukan komposisi kuantitatif keseluruhan itu

#### 2.2

##### **antibodi**

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari sel *limfoid* (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut. Antibodi digolongkan menurut cara kerjanya, seperti *agglutinin*, *bakteriolisin*, *hemolisin*, *opsonin*, *presipitin*, dll

#### 2.3

##### ***carrier* (pembawa)**

inang (*host*) yang tidak menunjukkan gejala klinis (biasanya setelah sembuh dari infeksi awal). Proses infeksi terus berjalan secara ringan (*latent*) dalam waktu yang lama (*persistent*). Bila terjadi stress, proses infeksi dapat meningkat (infeksi aktif) sampai menunjukkan gejala klinis

#### 2.4

##### ***cytophatic effect* (CPE )**

efek yang ditimbulkan berupa perubahan patologis dalam kultur sel

#### 2.5

##### **homogenat**

cairan yang berasal dari hasil gerusan organ

#### 2.6

##### ***numerical aperture* (na)**

ukuran lebarnya celah yang dilewati cahaya

### 3 Prinsip

Mengisolasi dan memurnikan virus ikan yang digunakan pada kultur kemudian diidentifikasi dengan metoda uji netralisasi.



## 4 Peralatan

### 4.1 Peralatan kultur *Channel Catfish Ovary* (CCO)

- a) alat sterilisasi;
- b) *biological safety cabinet* kelas IIA;
- c) botol *flask* kultur ukuran 25 ml atau 75 ml;
- d) botol media;
- e) erlenmeyer 100 ml;
- f) inkubator CO<sub>2</sub>;
- g) *inverted* mikroskop;
- h) mikropipet (20 µl sampai dengan 200 µl dan 200 µl sampai dengan 1 000 µl);
- i) mortar dan *pestle*;
- j) papan autopsi, *disecting set*;
- k) *plate multiwell* 24;
- l) pH meter;
- m) sentrifus (minimal 3 000 rpm);

**CATATAN** point g) menggunakan inkubator biasa apabila media mengandung *carbonat*.

### 4.2 Peralatan netralisasi

- a) inkubator;
- b) mikrotube;
- c) mikropipet;
- d) mikroskop fase kontras, mikroskop *inverted*.
- e) *multiwell plate*
- f) sentrifus.

## 5 Bahan

### 5.1 Bahan diagnosa kultur *Channel Catfish Ovary* (CCO)

- a) alkohol 70 %;
- b) antibiotik *Penicillin – Streptomycin* (Penstrep) ;
- c) *Eagle's Minimum Essential Medium* (*Eagle-MEM*);
- d) 10 % *fetal calf serum* (FCS);
- e) HEPES (*N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid*) p.a/GR;
- f) *L-glutamin*;
- g) *mycostatin*;
- h) organ (*ovarium channel catfish*);
- i) *phosphate bufer saline* (PBS);
- j) *Sodium bikarbonat* (NaHCO<sub>3</sub>) p.a/GR;
- k) Sel *monolayer* (CCO);
- l) *Tween 80*;
- m) *Tris buffer, trypsin- ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA).

### 5.2 Bahan netralisasi

- a) cairan antibodi spesifik : larutan *neutralising antibody* (Nab) harus memiliki titer reduksi minimal 50 % dari 2000 PFU;
- b) media kultur yang mengandung CPE (virus yang akan diuji);
- c) alkohol 20 %;
- d) 1 % larutan kristal violet.



## 6 Prosedur

### 6.1 Metode diagnosa CCV

#### 6.1.1 Inokulasi contoh pada sel *monolayer*

- bersihkan permukaan tubuh ikan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70 %.
- bedah ikan menggunakan peralatan bedah steril, ambil organ target (ginjal).
- buat suspensi 10 % dari organ target (1 bagian ginjal ditambah 9 bagian PBS digerus dalam mortar dingin).
- sentrifugasi suspensi pada 3 000 rpm selama 15 menit 4 °C lalu ambil supernatannya.
- encerkan supernatan 10 kali.
- saring supernatan dengan *filter* yang memiliki ukuran pori (*pore size*) 0,45 µm.
- tambahkan antibiotik pada *filtrat* sebanyak 1000 IU/ml.
- inkubasi pada suhu 25 °C - 30 °C selama 30 menit - 60 menit.
- teteskan *filtrat* ke botol *flask* kultur yang berisi sel *monolayer* CCO dengan dosis 100 µl per 2 cm<sup>2</sup> sel *monolayer*. Biarkan selama 1 jam pada temperatur 25 °C – 30 °C.
- pada sel di dalam *plate* yang berisi 24 sumuran (*multiwell*), tambahkan medium kultur yang mengandung 10% FBS pH 7,6; 1 ml setiap sumuran (*well*).
- inkubasikan pada suhu 25 °C - 30 °C.

#### 6.1.2 Pengamatan CPE

- pertahankan pH dari media kultur tersebut antara 7,3 – 7,6 selama inkubasi, dengan menambahkan *buffer bicarbonat* ke dalam medium (untuk kultur sel yang ditumbuhkan dalam botol yang bertutup rapat pada inkubator biasa atau dalam botol yang tidak bertutup rapat pada inkubator CO<sub>2</sub>), atau 2 M *tris buffer* atau 25 mM medium yang di-*buffer* dengan HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid).
- amati perkembangan CPE (mikroskop pembesaran 40 kali – 100 kali) selama 10 hari.
- virus lain yang mungkin tumbuh adalah Ictalurid herpesvirus (IcHV2), catfish iridovirus dan catfish reovirus yang memproduksi tipe CPE yang mirip. Bedanya IcHV2 dan catfish iridovirus bisa bereplikasi di sel selapis BF2 (*Blue gill Fry*) dan EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*). Selain itu catfish iridovirus menghasilkan CPE yang berbeda (sel membulat dan terdapat badan inklusi dalam sitoplasma (*cytoplasmic inclusion bodies*)). Catfish reovirus menyebabkan syncytia juga pada CCO tapi bedanya pertumbuhannya lambat.
- konfirmasi dibutuhkan dengan metoda serologi atau molecular.

#### CATATAN

- direkomendasikan pengamatan menggunakan mikroskop fase kontras.
- CPE menyebar cepat dalam sel culture dari bagian yang terinfeksi.
- serangan akut CCVD umumnya memiliki tingkat kandungan virus yang tinggi
- ikan karier/virus laten jarang dapat dikultur
- serangan kronis atau subklinis memerlukan masa inkubasi yang lebih lama dan *blind passage* (passase dilakukan meskipun tidak menunjukkan CPE).
- CCV hanya bisa tumbuh baik pada sel selapis (*cell line*) ikan ictaluridae dan claridae.

#### 6.1.3 Subkultivasi

- panen medium dari kultur sel yang tidak muncul CPE nya.
- inokulasikan medium tersebut ke kultur sel *monolayer* yang baru. (sesuai dengan prosedur preparasi inokulasi contoh pada sel *monolayer*.)
- inkubasikan dan amati (sesuai dengan prosedur pengamatan CPE).
- apabila CPE terbentuk dalam kultur sel yang diinokulasi dengan cara pengenceran, maka harus segera dilakukan proses identifikasi (lihat bagian 7.2)



- e) apabila CPE masih belum terbentuk, maka proses subkultur diulang sekali lagi, dan diamati munculnya CPE selama 7 hari. Jika setelah subkultur sel yang ke dua masih tidak muncul CPE maka hasil pengujian dinyatakan negatif.

## 6.2 Identifikasi CCV dengan metode netralisasi

- a) panen media kultur yang mengandung CPE dengan menggunakan *trypsin- ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) kemudian setelah 5 menit dibuang dan ketukkan flask untuk melepaskan sel monolayer. Selanjutnya, masukkan MEM dan goyangkan *flask*. Kemudian tuang isinya ke dalam tabung sentrifus 15 ml.
- b) sentrifugasi pada 5 000 rpm selama 15 menit pada 4 °C.
- c) encerkan media berisi virus dari  $10^{-2}$  sampai  $10^{-4}$ .
- d) buat *aliquot* (200 µl).
- e) campurkan cairan virus (*aliquot*) dengan volume yang setara dengan cairan antibodi spesifik untuk CCV (Larutan *neutralising antibody* (Nab) harus memiliki titer reduksi minimal 50 % dari 2000 PFU)
- f) lakukan secara bersamaan tes netralisasi positif terhadap virus *homolog* dan tes netralisasi negatif terhadap virus *heterolog*.
- g) inkubasi semua campuran tersebut dalam suhu 25 °C selama 1 jam.
- h) transfer *aliquot* masing-masing campuran diatas pada sel *monolayer* (dua ulangan untuk satu konsentrasi virus).
- i) inkubasi selama 30 menit sampai 60 menit pada 25 °C kemudian gunakan 50 µl inokulum pada 24 sumuran (*well plate*) atau 12 sumuran (*well plate*).
- j) tambahkan media kultur sel yang mengandung 2% FBS yang telah dipertahankan pada pH 7,3 – pH 7,6, pada tiap sumuran dan inkubasikan pada suhu 25 °C – 30 °C.
- k) periksa kultur sel terhadap munculnya CPE.
- l) baca hasilnya segera setelah terjadi CPE pada kontrol tanpa serum *control non netralisasi* (*control non netralisasi*). Buang media kultur sel dan warnai sel *monolayer* dengan 1 % larutan kristal violet dalam alkohol 20 %.

## 7 Interpretasi hasil

### 7.1 Metode diagnosa CCV

#### 7.1.1 Inokulasi contoh pada sel *monolayer*

- a) segera lakukan identifikasi bila muncul CPE pada kultur yang diinokulasi dengan suspensi organ yang diuji.
- b) lakukan subkultur selama 7 hari, bila tidak terjadi CPE pada kultur sel yang diinokulasi (sedangkan pada kontrol virus ada terbentuk CPE).
- c) ulangi proses uji dengan sel organ uji yang masih baru (segar), bila kultur yang diinokulasi dengan kontrol virus tidak membentuk CPE.

#### 7.1.2 Subkultivasi

Lakukan subkultur yang ke dua bila subkultur yang pertama masih negatif.

### 7.2 Identifikasi CCV dengan metode netralisasi

- a) virus yang diuji diidentifikasi sebagai CCV bila CPE tidak terbentuk atau terjadi perlambatan pertumbuhan yang nyata pada kultur sel yang telah diberi campuran suspensi virus dan antibodi spesifik CCV. Sedangkan pada kultur sel yang tidak diberi antibodi akan muncul CPE. (kontrol *non netralisasi*)



- b) bila tidak terjadi netralisasi terhadap CCV, harus dilakukan uji IFA (*Indirect Fluorescent Antibody*), ELISA, atau uji berdasar asam nukleat spesifik CCV (PCR) terhadap contoh yang dicurigai.

## 8 Pelaporan

Contoh dinyatakan menderita CCVD jika terjadi *cytophatic effect* (CPE) menciri CCV pada kultur *Channel Catfish Ovary* (CCO) dan positif pada salah satu pemeriksaan identifikasi.





**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan media dan pereaksi**

**A.1 Phospat Buffer Saline (PBS)**

Bahan:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Akuades	800 ml

Cara membuat:

- Larutkan semua bahan diatas kemudian sesuaikan pH.
- Aduk hingga semua bahan larut.
- Tambahkan akuades sampai 1 000 ml.

**A.2 Media kultur Chanel Catfish Ovary (CCO)**

Cara membuat:

- Campurkan satu *sachet* bubuk MEM dengan 800 ml akuades bebas *pyrogen*.
- Tambahkan 3,6 g HCO<sub>3</sub>.
- Aduk hingga semua bahan larut.
- Tambahkan akuades bebas *pyrogen* sampai 1 000 ml.  
Sterilkan dengan cara difilter menggunakan filter ukuran pori (*pore size*) 0,22 µm.

**A.3 Buffer 10x tris (0.5 M)**

Cara membuat:

- Campur *tris* base (60,57 g/l), *sodium chloride* (89 g – 90 g), dan *hydrochloric acid* (30 ml).
- Sesuaikan pH 7,8.
- Encerkan 10 kali saat akan digunakan.

**A.4 PBST (Phoaspat Buffered Saline-Tween)**

Cara membuat:

Campur 0.01 M PBS pH 7,2 dengan 0,05% *tween* 80.

**A.5 Buffer proteinase K**

Cara membuat:

- Campurkan 50 mM KCl, 15 mM *tris*-HCl pH 8.3 dan 0,5% *nonidet* P-40.
- Tambahkan 0,5 mg *proteinase* K untuk setiap ml campuran di atas.



**A.6 1 M HEPES, pH 7,5**

Cara membuat :

- Larutkan 23,83 g HEPES dengan akuabidest (*double distilled water/ ddH<sub>2</sub>O*) sampai mencapai 100 ml.
- Atur pH agar 7,5 dengan menggunakan *potassium hydroxide* (KOH) dan asam klorida (HCl).
- Simpan pada suhu 4 °C.

**A.7 Trypsin/EDTA (0,025% Trypsin 0,01% EDTA)**

Cara membuat :

- Larutkan bahan berikut ini ;
 

Trypsin	125	mg
EDTA	50	mg
HBSS	500	ml

 Sehingga diperoleh total volume campuran sebesar 500 ml.
- Kemudian larutan campuran tersebut difilter, disterilisasi, dialiquot (dibagi-bagi dalam kemasan siap pakai).
- Larutan disimpan dalam botol gelap bertutup rapat pada suhu - 20 °C.

**A.8 Kristal Violet 1 %**

Cara membuat:

- Larutkan 0,1 % (w/v; berat/volume) *crystal violet* dalam 20 % ethanol.
- Larutan campuran ini dapat disimpan lama dalam botol gelap bertutup rapat pada suhu ruang.

**A.9 Alkohol 70 %**

Cara membuat:

Ambil 70 ml alkohol p.a/GR kemudian tambahkan akuades hingga mencapai 100 ml.

**A.10 Alkohol 20 %**

Cara membuat:

Ambil 20 ml alkohol p.a/GR kemudian tambahkan akuades hingga mencapai 100 ml.



## Bibliografi

Australian Government, 2004. *Disease of Finfish, Viral diseases- Channel catfish virus diseases*. Departement of Agriculture, Fisheries and Forestry ([www.disease-watch.com](http://www.disease-watch.com))

Metode standar pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina golongan virus.

OIE, 2006. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*, Office des International des Epizooties (OIE). *chapter 2.6.1*.

